

**Tierexperimentelle Studien
zur Frage einer Isosensibilisierung mit Tumorproteinen**

**II. Mitteilung, Austauschtransplantationen von Tumoren unter Tieren
verschiedener Zuchtstämme**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

1968

vorgelegt von
Uwe Mundhenke
aus Hamburg



Dekan: Professor Dr. med. E. Wetterer

Referent: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 22. April 1968

Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses
Erlangen-Nürnberg (Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth)

Tierexperimentelle Studien zur Frage einer Isosensibilisierung mit Tumorproteinen

II. Mitteilung. Austauschtransplantationen von Tumoren unter Tieren verschiedener Zuchtstämme

F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ und U. MUNDHENKE

Eingegangen: 18. Juli 1968.

In einer früheren Versuchsserie des eigenen Arbeitskreises [19] wurden zur Frage einer Isosensibilisierung mit Tumorproteinen an Tieren ein und desselben Stammes Austauschtransplantationen von inokulierten Yoshida-Sarkomen vorgenommen in der Absicht, unter Ausnutzung der relativen Individualfremdheit eine immunologische Transplantationsreaktion zu induzieren. Die Versuchsanordnung schien jedoch nicht genügend geeignet als Modell für eine Isosensibilisierung, d. h. die Tiere, die zwar keine reinen Inzucht-tiere waren, zeigten dennoch keine ausreichende Individualfremdheit.

In vorliegender Arbeit sollten deshalb die Versuche mit gekreuzter Tumortransplantation unter Tieren verschiedener Stämme vorgenommen werden.

Die Versuche sollen insgesamt eine Studie darstellen zur Frage einer immunologischen Therapie maligner Prozesse unter Ausnutzung des Isosensibilisierungsprinzips, dem namhafte Immunologen die besten Erfolgsaussichten auf diesem Sektor einräumen.

1. Untersuchungsgut und Versuchsanordnung

In vorliegender tierexperimenteller Untersuchungsreihe wurden unter Rattenpaaren verschiedener Stämme Austauschtransplantationen von transplantierten Malignomen vorgenommen. Es wurden insgesamt 30 Wistar-Ratten¹ in

¹ 15 Tiere wurden aus der Versuchstieranstalt Hannover, 15 von der Fa. Kramer, Köln, bezogen.

Versuch genommen. Sämtliche Tiere erhielten an zwei verschiedenen Stellen Tumorzellen eines rattentransplantablen Tumors² inokuliert, subsarkolemmal in die Nackenmuskulatur. Einer der herangewachsenen Tumoren wurde exstirpiert und dessen Zellen einem Tier des anderen Stammes transplantiert. Umgekehrt wurde von letzterem ebenfalls ein Tumor in toto operiert und dessen Zellen der ersten Ratte übertragen. Es wurde sodann jeweils ein Rattenpaar verschiedener Herkunft mit gegenseitig ausgetauschtem Tumormaterial beobachtet (siehe Schema in Abb. 1).

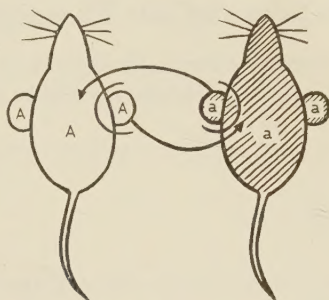


Abb. 1. Schema zur Versuchsanordnung.

Vor Versuchsbeginn sowie am Ende des Versuches wurden die Seren sämtlicher Tiere auf zirkulierende Tumor-Antikörper sowie auf Veränderungen in ihrer Serumeiweißkonstellation untersucht. Folgende Methoden kamen zur Anwendung: Papierelektrophorese, passive Hämagglutinationsreaktion nach *Boyd* sowie zweidimensionale Immunodiffusion nach *Ouchterlony*.

II. Methodik

1. *Transplantationstechnik*
(siehe I. Mitteilung).
2. *Tumorexstirpation (Operationstechnik)*
(siehe I. Mitteilung).
3. *Antikörperrnachweismethoden*
(siehe I. Mitteilung).

² Tumortragende Tiere wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Grundmann, Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Walker-Carcinome. Wiewohl in der I. Mitteilung [19] über die Versuche mit Yoshida-Sarkom berichtet wurde, so halten wir die vorliegende Arbeit dennoch für vergleichbar mit jener. In einer Reihe von Laborversuchen [11, 20] mit beiden Tumoren konnten wir feststellen, daß das immunologische Verhalten beider Tumoren gleichartig ist, so daß es sich erübrigt, über gleiche Versuchsreihen mit beiden Tumoren zu berichten.

Ergebnisse

1. Beobachtungen an den Versuchstieren

Die Ersttransplantate zeigten nach durchschnittlich 5 Tagen seit Übertragung der Tumorzellen eine etwa linsen- bis erbsengroße Tumorentwicklung. Das weitere Wachstum dieser malignen Geschwülste erfolgte von nun an zusehends. Bereits am 7. Tag nach Ersttransplantation wurde die Austauschtransplantation eines der beiden Tumoren vorgenommen. Um diesen Zeitpunkt waren die malignen Zellen zu Tumoren mit einem Durchmesser von mindestens 7—10 mm, in vier Fällen bereits 2,5 cm Längsachse herangewachsen.

Von den 30 operierten Ratten überlebten alle den Eingriff.

Unmittelbar nach der Operation kam es zu einer relativen Wachstumshemmung des verbliebenen Tumors. Das Angehen des Zweittransplantates war bei allen Ratten um den 5. Tag nach der Zellübertragung zu objektivieren. Beide Tumoren wuchsen von nun an sukzessive weiter heran, es kam aber bei den Ersttransplantaten zu keinem überstürzten Wachstum und zu keinen Zerfallserscheinungen, wie das sonst bei lediglich transplantierten Tieren ohne weitere Behandlung nahezu regelmäßig beobachtet wird.

Die Gesamtverfassung der Versuchstiere war, gemessen an ihrer Freßlust, der Beschaffenheit ihres Felles und ihrer Agilität praktisch unbeeinflusst. Vom 12. bis 15. Tag nach Zweittransplantation an kam es bei insgesamt 17 Tieren zu einer Rückbildung zunächst des sekundär transplantierten Tumors, während von den übrigen 13 Ratten 4 und von nun an die weiteren 9 Tiere nacheinander eingingen, bzw. wegen schwerer Verfallserscheinungen zur Gewinnung ausreichender Serummengen in Narkose entblutet wurden. Bei den 17 genannten Versuchstieren kam es nach weiteren 2 Tagen zu einem Stehen des Wachstums auch der Ersttransplantate. Dennoch gingen auch von diesen 17 Ratten 7 Tiere nacheinander ein. In drei Fällen waren Symptome vom Typ eines anaphylaktischen Schocks mit Schnauz- und Pfotenödemen vorausgegangen, in den übrigen vier Fällen war eine hochgradige Kachexie aufgetreten.

Bei 10 Tieren waren vom 17. Tag nach Zweittransplantation (25. Tag nach Ersttransplantation) an *beide Tumoren sukzessive bis zum völligen Schwinden zurückgegangen*.

Die Ratten nahmen unter gesteigerter Freßlust zu, das Fell verdichtete sich, sie überlebten bis zu acht Wochen, wonach sie

dann letztmalig kontrolliert und in Narkose entblutet wurden. Auf Grund des makroskopischen Sektionsbefundes waren an den Inokulationsstellen der Erst- wie auch der Zweittransplantate keine Residuen eines Zellinfiltrates mehr nachweisbar.

2. Antikörperrnachweis-Reaktionen

Mit der *passiven Hämagglutinationsreaktion nach Boyden* wurden unter den 30 nicht behandelten Ratten (Ausgangswerte) in 4 Fällen Hämagglutinationsreaktionen mit Titern zwischen 1 : 4 und 1 : 32 nachgewiesen. Unter den 13 Tieren, deren Tumorstadium während des Versuchs praktisch unbeeinflusst blieb, ergaben sich in insgesamt 3 Fällen ebenfalls positive Hämagglutinationsreaktionen mit Titern zwischen 1 : 8 und 1 : 32.

Von den 17 Ratten mit Tumorstadiumshemmung waren mit den Seren von 12 Tieren bei erster Kontrolle Titerwerte zwischen 1 : 4 und 1 : 64 nachweisbar. Hier fiel allerdings ein eigentümliches Phänomen einer Hemmzonenentwicklung in den höheren Konzentrationen der Verdünnungsreihe auf. Die Titerangaben beziehen sich auf die Verdünnungsstufen unter Weglassung der Hemmzone. Bei Kontrolle nach 8 Wochen Beobachtungszeit fanden sich bei 8 von den 10 verbliebenen Tieren dieser Reihe ebenfalls positive Erythrocyten-Agglutinationen, allerdings hier mit Titern von nur 1 : 4 und 1 : 8.

Präzipitierende Antikörper (*zweidimensionale Immunodiffusion nach Ouchterlony*) waren praktisch in keinem Fall und zu keinem Zeitpunkt der hier beobachteten Versuche nachweisbar.

3. Verhalten der Serumeiweißkörper

Vergleicht man die Gruppen der Tiere, die keine Wachstumshemmung ihrer Tumortransplantate aufgewiesen haben, mit denjenigen Tieren, deren Tumoren völlig geschwunden sind, so läßt sich feststellen, daß die erstgenannte Gruppe während der Beobachtungszeit eine tiefgreifende Dysproteinämie entwickelt hat: Es kam zu einem signifikanten Abfall des Albumins mit relativ starker Vermehrung der α_1 -, α_2 -, α_2/β - und auch β -Globuline, während die γ -Globuline keine Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten aufwiesen.

Statistisch gesichert ist vor allem die Zunahme der β -Globuline, während die der α -Globuline infolge zu großer Streuung allenfalls

bei einer Sicherungsgrenze von $P = 0,8$, nicht aber für eine größere Genauigkeit signifikant ist. In der verglichenen Gruppe war die Dysproteinämie kaum auffällig. Eine Zunahme der Globuline war allenfalls für die β -Globuline nachweisbar.

Diskussion

Die in der vorliegenden Versuchsanordnung demonstrierbare Hemmung von Tumorstadium bis zu einer völligen Zurückdrängung gekreuzt transplantierte, sowie ersttransplantierte Tumoren unter individualfremden Rattenstämmen darf wohl als Ausdruck eines Isosensibilisierungseffektes mit teilweiser oder völliger Abstoßung des Tumorgewebes gewertet werden. Ein Individuum A bildet gegen Isoantigene, also z. B. gegen Normal- und ebenso gegen Tumorproteine eines individualfremden Stammes B Isoantikörper.

Es bildet sich mit Bezug auf das Tumorantigen ein Antikörper gegen die Eigenschaft B, als auch gegen die Tumorproteine als solche. Damit wird zugleich erklärbar, daß die auf dem Wege einer solchen Isosensibilisierung induzierten Anti-Tumor-Antikörper nunmehr nicht nur gegen das gekreuzt übertragene Isozweittransplantat, sondern auch gegen den ersttransplantierten Tumor gerichtet werden.

Wie in den Ergebnissen dargelegt, kam es im vorliegenden Untersuchungsgut bei 10 Tieren, d. h. in 33,3% zu einer völligen, und bei weiteren 7 Tieren, das sind 23,3%, zu einer zwar deutlichen Rückbildung, aber zu keinem völligen Schwund der transplantierten Tumoren; die genannten 7 Tiere gingen unter den Zeichen einer schweren Kachexie zugrunde. Insgesamt konnte immerhin in 56,6% der im Versuch gestandenen Tiere ein tumorhemmender Effekt wahrgenommen werden.

Eine Spontanremission der erstinokulierten wie auch der später unter individualfremden Rattenstämmen gekreuzt transplantierten Tumoren liegt unseres Erachtens für die vorliegende Versuchsanordnung nicht vor. Spontanremissionen von transplantierten Tumoren im Tierversuch sowie Spontanremissionen von Tumoren in der Humanpathologie sind zweifellos immer wieder gesehen worden [1, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 23, 24]. Wir dürfen jedoch auf ein inzwischen großes Beobachtungs- und Erfahrungsgut mit Walker- und

Yoshida-Tumoren unter verschiedenen Bedingungen [11, 20, 22] hinweisen, wonach in keinem Falle Spontanremissionen mit diesen rattentransplantablen Tumoren wahrgenommen worden sind. Das gilt insbesondere auch für die gleiche Versuchsanordnung an Ratten ein und desselben Stammes [19], wobei ebenfalls keine Spontanremission offensichtlich wurde.

Die Tatsache, daß die vorliegenden serologischen Untersuchungen mit Bezug auf den Nachweis zirkulierender Tumor-Antikörper nur agglutinierende Faktoren mit niedrigen Titern ergeben haben, spricht keineswegs gegen eine Isosensibilisierung. Eine Überprüfung der serologischen Befunde unter Berücksichtigung der Lymphozyten ist derzeit im Gange und soll in anderem Zusammenhang publiziert werden.

Die Serumeiweißkörper der unbehandelten Ratten zeigten im vorliegenden Untersuchungsgut eine gute Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [2, 16, 18, 21]. Die Gruppe ohne sichere Zeichen einer Tumorstadiumshemmung wies am Ende des Versuches eine deutliche Dysproteinämie mit relativer Vermehrung der α - und β -Globuline auf; die γ -Globulinfraktionen erschienen relativ vermindert, bzw. gegenüber den Ausgangswerten unbeeinflusst. Dieser Dysproteinämietyp entspricht der Relationsverschiebung von Serumeiweißkörpern, wie sie allgemein bei Tumorträgern bekannt sind [3, 4, 7, 10, 11, 12, 15, 20, 22, 25].

Demgegenüber war in der Gruppe der Tiere, bei welchen eine Rückbildung der Tumortransplantate zu verzeichnen war, die Dysproteinämie — zumindest am Ende des Versuches — nicht mehr ausgeprägt.

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnte bestätigt werden, daß unter Ausnutzung eines Isosensibilisierungseffektes die Möglichkeit einer gezielten immunologischen Therapie maligner Geschwülste gegeben ist. Das Experiment zeigt allerdings, daß offenbar auch hier optimale Voraussetzungen gegeben sein müssen. Eine dieser Voraussetzungen scheint eine optimale Abwehrlage im Vergleich zur Tumorgroße zu sein. Mit anderen Worten, es ist offenbar eine Diskrepanz zwischen Wachstumsrate und spezifischem Antikörperangebot (Unterangebot) zu vermeiden. In die Praxis umgesetzt wäre die chirurgische und immunologische Kombinationsbehandlung wohl die optimal moderne Therapie, wobei z. B. selbst ein inoperabler Tumor weitgehend excidiert und anschließend immunologisch nachbehandelt werden sollte.

Zusammenfassung

Unter tumortragenden Rattenpaaren verschiedener Stämme wurden Austauschtransplantationen mit einem von zwei transplantierten Tumoren vorgenommen. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer faßbaren Isosensibilisierungsreaktion: in 56,6% wurde eine bemerkenswerte Rückbildung sowohl des ersttransplantierten als auch des später gekreuzt transplantierten Tumors wahrgenommen; in 33,3% wurde nach etwa 3 Wochen ein völliger Schwund der inokulierten Tumoren festgestellt; in den übrigen 23,3% war die Rückbildung der Tumoren nicht komplett. In den meisten Rattenserum wurden agglutinierende Antikörper, nicht jedoch präzipitierende Antikörper nachgewiesen. Die Serum-eiweißkörper zeigten eine anfängliche Dysproteinämie, gegen Ende des Versuches die Tendenz zur Normalisierung ihrer Serumproteinrelationen.

Summary

Among pairs of rats from different strains bearing Walker-carcinoma on two different spots one of the tumours was excised and the cells of it implanted into the other host. This modus of crossed tumour transplantation led to an iso-immune response: in 56.6% there was a remarkable inhibition of tumour growth concerning in first tumour cell transplantate as well as the second one; in 33.3% a complete disappearance was noted after a time of about 3 weeks; in the other 23.3% the dwindling of tumours was not so complete. In most of the rat's sera positive hemagglutination reactions with tumour homogenate were observed. But no precipitating antibodies were detected. The serum proteins showed an initial dysproteinemia and at the end of the experience the tendency of normalizing their protein relations.

Literatur

1. *Alexander, P.*: Cellular resistance to tumours. Brit. med. Bull. 23: 86 (1967).
2. *Berg, G.; Kimbel, H. und Scheiffarth, F.*: Zur Schwankungsbreite der Serum-eiweißfraktionen normaler Versuchsratten. Naturwissenschaften 42: 51 (1955).
3. *Caputo, A. and Marcante, M. L.*: Protein changes occurring in blood serum and ascitic fluid in rats with Yoshida ascites tumours. Acta un. int. 19: 99 (1962).
4. *Catchpole, H. R.*: Serum and tissue glycoproteins in mice bearing transplantable tumours. Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y. 75: 221 (1950).
5. *Cinader, B.; Hayley, M. A.; Rider, W. D. and Warwick, O. H.*: Zit. in [1].
6. *Denoix, P.*: Mechanisms of invasion in cancer (Springer, Berlin/Heidelberg/New York 1967).
7. *Dittmer, A.*: Papierelektrophorese, Grundlagen, Methodik. Klinische Betrachtungen (Jena 1956).
8. *Everson, T. C.*: Zit. in [1].
9. *Everson, T. C. and Cole, W. H.*: Spontaneous regression of cancer. Preliminary report. Ann. Surg. 114: 366 (1956).
10. *Götz, H.*: Antigenität von Tumorproteinen. Habilitationsschrift, Erlangen (1968).

11. Götz, H.; Scheiffarth, F.; Warnatz, H. und Klobe, U.: Serologische und immunologische Studien an tumortragenden Ratten unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittl. II. Walker-Tumoren (für den Druck vorbereitet).
12. Kent, H. N. and Gey, G. C.: a) Changes in serum proteins during growth of malignant cells *in vitro*. Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 94: 205 (1957).
b) Selective uptake of serum globulins and glycoproteins by cells growing *in vitro*. Science 131: 667 (1960).
13. Milgrom, F.: A short review of immunological investigations on cancer. Canc. Res. 21: (1961).
14. Nadler, S. and Moore, G.: a) Immunologische Krebsterapie. Dtsch. Ärztebl. 3: (1966). b) Surg. Forum 26: 229 (1965). c) Ann. Surg. 164: 482 (1966).
15. Riva, G.: Das Serumeiweißbild. (Huber, Bern / Stuttgart 1957).
16. Scheiffarth, F. und Berg, G.: a) Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. I. Mitteilung: Die Normalwerte der Ratten und Kaninchen. Z. exp. Med. 119: 550 (1952).
b) Serumeiweißbestimmungen bei Ratten und Kaninchen mit der Papierelektrophorese. II. Mitteilung: Der Einfluß des Sensibilisierungsmodus auf das Verhalten der Serumeiweißkörper bei gleichem Antigen. Z. exp. Med. 123: 201 (1954).
17. Scheiffarth, F.; Berg, G. und Götz, H.: Papierelektrophorese in Klinik und Praxis (Urban und Schwarzenberg, München / Berlin 1962).
18. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Kneller, O.: Weitere statistische Untersuchungen der Serumeiweißkörper unbehandelter Albinoratten. Naturwissenschaften 44: 639 (1957).
19. Scheiffarth, F.; Götz, H. und Lehr, E.: Tierexperimentelle Studien zur Iso-sensibilisierung mit Tumorproteinen. I. Mitteilung: Versuche an ein und demselben Tierstamm. Z. exp. Med. (im Druck).
20. Scheiffarth, F.; Götz, H.; Warnatz, H. und Günther, K.: Serologische und immunologische Studien an tumortragenden Ratten unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittl. I. Yoshida-Tumoren (für den Druck vorbereitet).
21. Scheiffarth, F.; Legler, F. und Berg, G.: Experimentelle Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der humoral faßbaren Antikörperproduktion durch die Hormone des Hypophysen-Nebennieren-Systems. I. Mitteilung: Das Verhalten der Antistreptolysinreaktion und der Serumeiweißkörper unter ACTH. Z. exp. Med. 120: 558 (1953).
22. Scheiffarth, F.; Warnatz, H.; Götz, H. und Rohrwasser, M.: Immunologische Studien am Walker-Carcinom und Yoshida-Sarkom. Z. Krebsforsch. 70: 178 (1967).
23. Smithers, D. W.: Zit. in [1].
24. Stewart, F. W.: Experiences in spontaneous regression of neoplastic disease in man. Rep. biol. Med. 10: 239 (1952).
25. Wuhrmann, F. und Märki, E.: Dysproteinämien und Paraproteinämien. Grundlagen, Klinik, Therapie (4. völlig neu bearbeitete Auflage von «Die Bluteiweißkörper des Menschen», Benno Schwabe, Basel 1963).

Adresse der Autoren: Prof. Dr. F. Scheiffarth, Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg, D-852 Erlangen (Deutschland).

L e b e n s l a u f

Am 30.12.1938 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Georg Mundhenke und seiner Ehefrau Hulda, geb. Tiede, in Hamburg geboren.

Nach der Ausbombung 1943 zogen wir nach Hohwacht/Ostsee in Schleswig-Holstein, wo ich Ostern 1946 eingeschult wurde. 1951 trat ich in das Staatliche Gymnasium Schloß Plön ein und legte dort im Februar 1962 mein Abitur ab.

Im Mai 1962 begann ich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg mein Medizinstudium und bestand im November 1964 das Physikum. Anschließend an das erste klinische Semester studierte ich ein Semester in Graz, um danach wieder nach Erlangen zurückzukehren.

Am 21.3.1968 legte ich dort das Staatsexamen ab.

